

## ẢNH HƯỞNG CỦA STRESS NaCl LÊN SỰ ỔN ĐỊNH CỦA CẤU TRÚC GENOME TẾ BÀO LÚA *ORYZA SATIVA* NUÔI CÂY DÀI HẠN *IN VITRO*

Nguyễn Thanh Thủy, Đỗ Quang Bình

Viện Công nghệ sinh học

### TÓM TẮT

Nuôi cấy *in vitro* các tế bào thực vật là một công cụ hữu ích cho các nghiên cứu liên quan tới chuyển hóa sinh học từ một tế bào đơn lẻ đến cây hoàn chỉnh *in vitro*. Sử dụng công nghệ *in vitro* này, các nhà nghiên cứu không chỉ có thể kiểm soát các chuỗi phản ứng sinh học mà còn tạo ra nhiều sản phẩm mới khác với những sản phẩm của các vật liệu khởi đầu. Tuy nhiên, sinh trưởng trong các điều kiện nhân tạo *in vitro* trong thời gian dài, tế bào thực vật không tránh khỏi hiện tượng biến dị soma. Mức độ biến dị của các tế bào nuôi cấy phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau gồm có kiểu gen và trạng thái sinh lý của vật liệu thực vật khởi đầu, các điều kiện nuôi cấy, thời gian nuôi cấy... Nghiên cứu này trình bày các kết quả liên quan tới những biến đổi phân tử trong genome của tế bào lúa (*Oryza sativa*) mà chúng đã được nuôi cấy trong một thời gian dài trong các điều kiện có stress muối (NaCl) khác nhau bằng kỹ thuật RADP. So sánh với vật liệu khởi đầu không bắt nguồn từ nuôi cấy các tế bào phân lập *in vitro*, genome của các tế bào nuôi cấy trong điều kiện không có stress NaCl mang nhiều biến đổi phân tử hơn genome của các tế bào nuôi cấy liên tục trong điều kiện có stress muối. Mặc dù các tế bào của hai dạng nuôi cấy này chia sẻ một số sự biến đổi đặc thù gây ra bởi nuôi cấy *in vitro* dài hạn, các tế bào thích nghi với stress muối chia sẻ nhiều sự tương đồng chung với vật liệu khởi đầu hơn là các tế bào không bị stress. Các kết quả thu được từ nghiên cứu hiện tại phù hợp với các quan sát trước đây của chúng tôi được tiến hành ở mức độ tế bào là tính toàn năng của các tế bào lúa phân lập được ổn định trong điều kiện nuôi cấy có stress muối thích hợp tốt hơn trong điều kiện không có yếu tố stress này.

**Từ khóa:** Biến dị khác biệt, nuôi cấy tế bào dài hạn, *Oryza sativa*, stress NaCl, sự ổn định của genome

### MỞ ĐẦU

Những phát hiện cơ bản về sự sinh trưởng không giới hạn của tế bào thực vật trong nuôi cấy *in vitro* và tính toàn năng của chúng đã tạo cơ sở cho hàng loạt hướng nghiên cứu như: tế bào học, sinh lý, hóa sinh tế bào, các quá trình sinh trưởng và phát triển của tế bào, nhân dòng cá thể, sản xuất các chất thứ cấp, loại bỏ bệnh virus, nghiên cứu tương tác giữa mô thực vật và các loại vi khuẩn tạo u - nốt sần ở cây và các nghiên cứu di truyền về biến dị, đột biến soma trong tế bào nuôi cấy, ứng dụng khả năng tạo cây đơn bội, dòng thuần trong chọn giống, dung hợp protoplast tạo dòng lai soma hay lai tế bào chất và chuyển DNA, ... (Gautheret, 1985).

Tính toàn năng của tế bào cây lúa trồng châu Á (*O. sativa* L.) cũng đã được nghiên cứu và chứng minh bằng kỹ thuật nuôi cấy mô, tế bào *in vitro*. Sau thí nghiệm tạo mô sẹo từ nội nhũ của cây ngô do La Rue (1949) thực hiện thành công, Fujiwara và Ojima (1955) đã tiến hành thí nghiệm nuôi các đoạn rễ lúa tách rời. Năm 1956, Amemiya và đồng tác giả tiến hành nuôi cấy phôi non của loài cây lương thực quan trọng này. Tuy nhiên, tiến bộ trong nuôi cấy mô tế bào các loài cây lương thực một lá mầm bắt đầu từ việc bổ

sung vào môi trường nuôi cấy một lượng chất điều hoà sinh trưởng ngoại sinh (Street, 1957). Furuhashi và Yatazawa (1964) đã tạo được mô sẹo từ đốt thân, trong khi Yatazawa và đồng tác giả (1967) tạo được mô sẹo từ rễ của cây mạ trong môi trường có bổ sung 2.4-D. Năm 1968 là năm đánh dấu sự trưởng thành quan trọng của kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào đối với cây lúa. Nhiều phòng thí nghiệm đã tái tạo được cây lúa hoàn chỉnh từ mô, tế bào có nguồn gốc từ vùng rễ của hạt (Nishi *et al.*, 1968), từ rễ (Kawata, 1968) và từ phôi lúa (Maeda, 1968; Tamura, 1968). Đặc biệt, Niizeki và Oono (1968) đã tái sinh được cây lúa đơn bội từ nuôi cấy bao phấn, tạo tiền đề cho khả năng ứng dụng một cách hữu hiệu phương pháp nuôi cấy đơn bội trong việc rút ngắn thời gian tạo dòng thuần và chọn giống lúa. Những năm tiếp theo được đánh dấu bằng các tiến bộ trong việc chọn dòng tế bào và tái sinh cây lúa từ nuôi cấy tế bào trong dung dịch lỏng (Abe *et al.*, 1991; Bình, Heszky, 1990; Gobel *et al.*, 1985). Những thí nghiệm về nuôi cấy tế bào trần của lúa cũng đã được tiến hành từ đầu những năm 1970 (Harn, 1973; Deka, Sen, 1976). Thành công trong việc tái tạo cây lúa hoàn chỉnh từ nuôi cấy tế bào trần bắt đầu đạt được từ giữa những năm 1980 (Abdullah *et al.*, 1986; Datta *et al.*, 1992; Fujimura *et*

al., 1985; Jenes, Pauk, 1989). Bên cạnh đó, những nghiên cứu về ảnh hưởng của các loại stress khác nhau (NaCl, P, ...) lên sự tái tạo lại thành tế bào của tế bào trần và khả năng phân chia tế bào của chúng cũng đã được quan tâm (Binh, 1995). Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào *in vitro* đã được ứng dụng một cách có hiệu quả trong nghiên cứu tế bào, chọn dòng chống chịu các loại stress sinh học và các loại stress môi trường, tạo các giống lúa mới ở Việt Nam (Phan Thị Bày *et al.*, 2001; Nghiênm Như Vân, 1983; Phong *et al.*, 2001) cũng như ở một số nước khác (Heszky *et al.* 1996; Lestari, 2006).

Cùng với thành công trong việc điều khiển quá trình sinh trưởng và phát triển của tế bào thực vật trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* nhân tạo, các nhà nghiên cứu còn phát hiện ra các hiện tượng biến dị và đột biến di truyền ở mức độ tế bào và cây tái sinh có nguồn gốc nuôi cấy mô *in vitro* (Kabir *et al.*, 2008; Nishi *et al.*, 1968) cũng như ở mức độ phân tử DNA (Ngezahayo *et al.*, 2007; Rasheed *et al.*, 2005). Larkin và Scowcroft (1981) đã dùng thuật ngữ biến dị dòng soma cho các cây tái sinh có những sự thay đổi nhất định so với nguyên liệu gốc ban đầu. Scowcroft (1985) coi những sự thay đổi ở mức độ nhiễm sắc thể, hình thái, sinh hoá hay phân tử là sự bất ổn định do nuôi cấy *in vitro* gây ra.

Nghiên cứu này trình bày các kết quả về ảnh hưởng của stress NaCl lên sự ổn định của cấu trúc genome tế bào lúa *Oryza sativa* nuôi cấy dài hạn *in vitro* bằng kỹ thuật RADP (Random Amplification of Polymorphic DNA). Kết quả thu được phù hợp với các quan sát trước đây của chúng tôi được tiến hành ở mức độ tế bào là tính toàn năng của các tế bào lúa phân lập được nuôi cấy trong điều kiện có stress NaCl thích hợp đã duy trì sự ổn định của tính trạng này lâu dài hơn so với các tế bào sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* tương đồng nhưng không có yếu tố stress này (Binh, 1995; Binh, Heszky, 1990; Binh *et al.*, 1990, 1992, 1993).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Nguyên liệu**

Hai nguồn mô lúa nuôi cấy *in vitro* dài hạn trong môi trường có và không có stress muối (NaCl) có nguồn gốc từ hạt của một giống lúa *japonica* có nguồn gốc từ Hungary (Binh, Heszky, 1990). Hạt lúa được bóc vỏ, khử trùng, rồi được cấy chuyển lên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 2% saccharose, 2 mg/l 2.4-D, 0,5 mg/l kinetin và 1 mg/l

thiamine, pH 5,6 - 5,7 và 0,8% agar để tạo mô sơ cấp trước khi đưa vào nuôi cấy dung dịch lỏng. Trong quá trình nuôi cấy dài hạn, 2 năm đầu tiên tế bào lúa được nuôi cấy trong môi trường dung dịch lỏng không có stress muối NaCl (Binh, Heszky, 1990). Sáu năm tiếp theo, một phần tế bào này được cấy chuyển vào môi trường dung dịch lỏng có bổ sung 1,5% NaCl và phần còn lại vẫn tiếp tục được duy trì trên môi trường lỏng không có stress muối như cũ. Những năm sau của giai đoạn nuôi cấy trong điều kiện dung dịch lỏng có và không có stress muối này, các cụm tế bào được chuyển lên nuôi cấy trên môi trường thạch (0,8% agar) với nồng độ muối tương tự như trong môi trường dung dịch lỏng đã dùng trước đó (Binh, 1995). Mô được cấy chuyển sau 4 tuần và sinh trưởng ở nhiệt độ 27 - 28°C trong điều kiện ánh sáng khuếch tán yếu, khoảng 100 lux/10 h/ngày. Cây đối chứng có nguồn gốc từ hạt của giống lúa ban đầu được duy trì ở dạng cây non *in vitro*.

**Phương pháp**

Phản ứng RAPD được dùng trong nghiên cứu biến động genome của tế bào lúa nuôi cấy *in vitro* dài hạn. Phản ứng này được tiến hành trong thể tích dung dịch hỗn hợp là 25 µl với thành phần của phản ứng: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% gelatin, 200 µM mỗi loại dNTP, 0,5 đơn vị enzyme *Taq* DNA polymerase (Promega), 0,25 µg mỗi oligo ngẫu nhiên (Bảng 1) và 20 ng DNA tổng số của mỗi mẫu. Phản ứng được thực hiện theo chu trình nhiệt: biến tính ban đầu ở 96°C trong 3 phút, lặp lại 35 lần chu trình có bản (biến tính ở 96°C/45 giây, gắn mỗi vào khuôn ở 42°C/1 phút, kéo dài ở 72°C/2 phút), kéo dài ở 72°C/8 phút ở giai đoạn cuối của phản ứng. Sản phẩm của các phản ứng RAPD này được bảo quản ở -20°C để dùng cho những nghiên cứu tiếp theo.

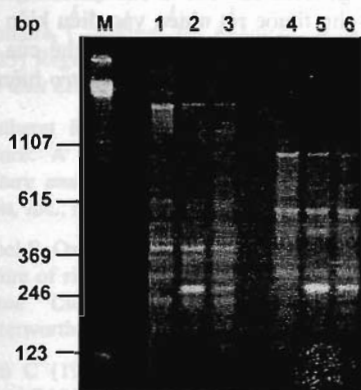
**Bảng 1.** Các đoạn mỗi oligonucleotide dùng trong phản ứng RAPD.

STT	Trình tự base (5' - 3')
1	gaggcctacgccccatagaa
2	aatgcgttgaggcgcagcag
3	cggaagcaattgctggct
4	gcaattactaiggtctggca
5	ctccctcatgattctggga
6	ttgttctgaccctggttca
7	caattcgaggatccagagac
8	tgcttgcacttgctgcta

Các phản ứng được lặp lại 3 lần, các băng hình ổn định được ghi nhận và số liệu được phân tích bằng phần mềm NTSYS-pc 1.80 (Rohtf, 1993).

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

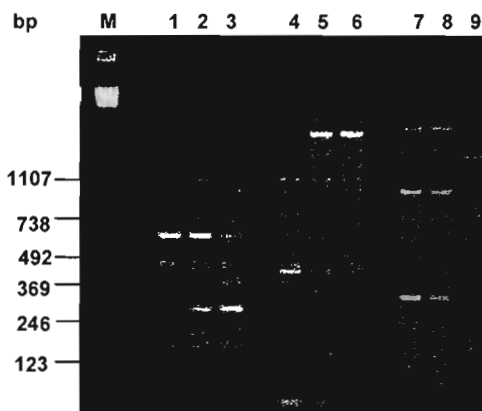
Những biến động trong cấu trúc của genome tế bào lúa nuôi cấy dài hạn trong các điều kiện có và không có stress muối NaCl được khảo sát bằng kỹ thuật RAPD với 8 mỗi oligo (Bảng 1). Sản phẩm của phản ứng RAPD với hai mẫu tế bào trên được so sánh với sản phẩm tương đồng của cây đối chứng. Kết quả điện di các sản phẩm RAPD cho thấy các mẫu DNA có nguồn gốc mô, tế bào khác nhau tạo ra các sản phẩm có mẫu băng đa hình DNA khác nhau (Hình 1, 2).



Hình 1. Điện di (gel agarose 1%) các sản phẩm RAPD với đoạn mỗi oligo số 3 (1 - 3) và 4 (4 - 6) của: genome cây đối chứng (1, 4), tế bào nuôi cấy *in vitro* dài hạn trong môi trường không có stress muối NaCl (2, 5) và có stress muối NaCl (3, 6). M: thang DNA chuẩn 123 bp (Gibco).

Trong số các băng đa hình, một số băng DNA chỉ đặc trưng cho mô của cây lúa đối chứng, hay các băng đại diện chung cho các loại tế bào lúa nuôi cấy *in vitro* mà không phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy có hoặc không có stress muối NaCl của chúng. Một số băng khác đặc trưng cho các tế bào nuôi cấy trong môi trường không có stress muối, hay các băng chỉ có mặt trong sản phẩm của phản ứng RAPD với DNA của tế bào nuôi cấy có stress muối và mô của cây đối chứng, ... Tổng hợp kết quả của phản ứng RAPD với 8 mỗi oligo và ba loại mẫu mô, tế bào thí nghiệm, chúng tôi thu được tổng số băng DNA là 50, trong số đó 20 băng là băng đa hình, chiếm tỷ lệ 40% (Bảng 2). Trên cơ sở các số liệu thu được từ phản

ứng RAPD, cây liên kết phân tử những vùng genome được khảo sát bằng 8 mỗi oligo dùng trong thí nghiệm này, của ba loại mô, tế bào khác nhau nói trên được xây dựng theo chương trình NTSYS-pc 1.80 (Hình 3).



Hình 2. Điện di (gel agarose 1%) các sản phẩm RAPD với đoạn mỗi oligo số 2 (1 - 3), 7 (4 - 6) và 8 (7 - 9) của: genome cây đối chứng (1, 4, 7), tế bào nuôi cấy *in vitro* dài hạn trong môi trường không có stress muối NaCl (2, 5, 8) và có stress muối NaCl (3, 6, 9). M: thang DNA chuẩn 123 bp (Gibco).

Bảng 2. Tỷ lệ băng đa hình dựa trên chỉ thị RAPD của genome có nguồn gốc từ cây đối chứng, tế bào nuôi cấy *in vitro* dài hạn trong môi trường không có stress muối NaCl, và có stress muối NaCl.

STT	Môi	Tổng số băng	Số băng đa hình
1	1	9	7
2	2	7	3
3	3	8	4
4	4	5	2
5	5	7	1
6	6	5	0
7	7	5	2
8	8	4	1
Tổng	8	50	20

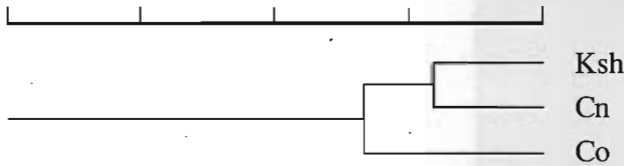
Qua hình cây liên kết dựa trên các chỉ thị phân tử RAPD, chúng tôi nhận thấy những vùng genome được khảo sát của tế bào lúa nuôi cấy trong điều kiện có stress muối NaCl có mức độ tương đồng với

những vùng genome tương ứng của mô cây đối chứng lớn hơn những vùng genome tương tự của tế bào nuôi cấy trong môi trường bình thường không có stress muối NaCl.

Kết quả thu được trong thí nghiệm này phản ánh những biến động trong cấu trúc phân tử xảy ra tại những vùng nhất định trong genome được khảo sát của các loại tế bào lúa nuôi cấy dài hạn *in vitro* trong các điều kiện có và không có stress NaCl là khác nhau. Genome của quần thể các tế bào sinh trưởng trong điều kiện có stress muối NaCl có mức độ ổn định cao hơn so với genome của quần thể các tế bào sinh trưởng trong môi trường cơ bản không có stress muối NaCl. Kết quả này phù hợp với những kết quả đã được công bố trước đây của chúng tôi (Bình, 1995; Bình, Heszky, 1990; Bình *et al.*, 1990, 1992, 1993) về tính ổn định cao trong sinh trưởng và tiềm năng tái sinh cây hoàn chỉnh của các tế bào tiền phôi lúa đã thích nghi với điều kiện nuôi cấy *in vitro* dài hạn có stress muối NaCl thích hợp. Biến động trong cấu trúc genome của tế bào lúa nuôi cấy *in vitro*

cũng đã được ghi nhận qua phản ứng RAPD với các dòng lúa tái sinh từ những dòng mô nuôi cấy ngắn hạn hơn trong các điều kiện chọn lọc khác (Ngezahayo *et al.*, 2007; Rasheed *et al.*, 2005; Phan Thị Bày *et al.*, 2001; Phong *et al.*, 2001). Cơ chế của hiện tượng biến dị soma hiện còn chưa được hiểu biết đầy đủ. Tuy nhiên, những nguyên nhân có khả năng dẫn tới biến dị soma (Barr, Jain, 1998) bao gồm: (1) Thay đổi ở mức độ nhiễm sắc thể; (2) Đột biến điểm; (3) Sự bất chéo và trao đổi đoạn của nhiễm sắc thể chị em; (4) Sự tái sắp xếp vị trí của gen; (5) Sự bội nhân DNA; (6) Hoạt động của các "gen nhảy"; (7) Sự methyl hóa DNA; (8) Những thay đổi trong DNA của cơ quan tử; (9) Biến dị chức năng của gen, ...

Nghiên cứu này ghi nhận được những biến động phân tử trong genome của các tế bào lúa nuôi cấy *in vitro* dài hạn phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện nuôi cấy trong đó có stress muối NaCl. Cơ chế của hiện tượng biến dị soma trong nuôi cấy *in vitro* hiện vẫn đang được tiếp tục nghiên cứu.



**Hình 3.** Cây liên kết dựa trên các chỉ thị phân tử (RAPD) của hai dòng tế bào nuôi cấy *in vitro* dài hạn trong môi trường không có stress muối NaCl (Co) và có stress muối NaCl (Cn) với cây đối chứng (Ksh).

**KẾT LUẬN**

Muối NaCl, ở nồng độ thích hợp như 1,5% NaCl dùng trong nghiên cứu hiện tại với mô, tế bào có nguồn gốc từ hạt lúa, có những ảnh hưởng tích cực nhất định lên sự ổn định của genome tế bào - một trong những yếu tố quyết định để duy trì tính toàn năng của chúng trong nuôi cấy *in vitro* dài hạn.

**Lời cảm ơn.** Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí một phần của đề tài nghiên cứu cấp cơ sở Viện Công nghệ sinh học và Quỹ học bổng UNIDO/ICGEB, Italy.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Abdullah R, Cocking EC, Thompson JA (1986) Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic

embryogenesis. *BioTech* 4: 1087-1090.

Abe T, Futsuhara Y (1991) Regeneration of rice plants from suspension culture. In: Bajaj YPS (Ed.) *Biotechnol Agricult Fores* 14: 38-45.

Barr DS, Jain SM (1998) Somaclonal variation: mechanism and application in crop improvement, In: Jain SM, Barr DS, Ahloowalia BS Eds. *Somaclonal Variation and Induced Mutation in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publisher: 15-38.

Bình DQ (1995) *In vitro* selection and characterization of salt tolerant cells in monocotyledonous plants. PhD Thesis, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary.

Bình DQ, Heszky LE (1990) Restoration of the regeneration potential of long-term cell culture in rice (*Oryza sativa* L.) by salt pretreatment. *J Plant Physiol* 136: 336-340.

Bình DQ, Heszky LE, Simon-Kiss I (1990) Increased plant

regeneration in immature inflorescence tissue culture of different rice hybrids by NaCl used in callus induction. *Oryza* 27: 409-414.

Binh DQ, Heszky LE, Gyulai G, Csillag A (1992) Plant regeneration of NaCl-pretreated cells from long-term suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.) in high saline conditions. *Plant Cell Tiss Org Cult* 29: 75-82.

Binh DQ, Fabian F, Heszky LE (1993) Responses to continuous and discontinuous NaCl stress of long-term cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Acta Biologica Hungarica* 44(2-3): 197-210.

Datta K, Potrykus I, Datta SK (1992) Efficient fertile plant regeneration from protoplasts of *indica* rice breeding line IR72 (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep* 11: 229-233.

Deka PC, Sen SK (1976) Differentiation in calli originated from isolated protoplast of rice (*Oryza sativa* L.) through plating technique. *Mol Gen Genet* 145: 239-243.

Fujamura T, Sakurai M, Akagi H, Negishi T, Hirose A (1985) Regeneration of rice plants from protoplast. *Plant Tiss Cult Lett* 2: 74-75.

Gautheret RJ (1985), History of plant tissue and cell culture: A personal account, In: Vasil IK (Ed.) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press, Inc., New York 2: 1-59.

Gobel E, Ozias-Akins P, Lors H (1985) Cell and protoplast culture of rice. In: Adersen PG, Withers LA (Eds.) *Plant Tissue Culture and Its Agricultural Application*. Butterworth, Kent., 359-365.

Ham C (1973) Fusion of protoplast isolated from rice callus. *SABRAO News* 5: 107-110.

Heszky LE, Simon-Kiss I, Binh DQ (1996) Release of rice variety 'DAMA' developed through haploid somaclonal breeding. In: Bajaj YPS (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 36. (Somaclonal variation in Crop Improvement II.) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York: 46-54.

Jenes B, Pauk J (1989) Plant regeneration from protoplast derived calli in rice (*Oryza sativa* L.) using dicamba. *Plant Sci* 63: 187-198.

Kabir AH, Mahfuz I, Razvy MA, Ahmed MB, Alan MF (2008) Indirect organogenesis and somaclonal variation in four rice cultivars of Bangladesh. *J Appl Sci Res* 4(4): 451-458.

Kawata S, Ishihara A (1968) The regeneration of rice plant, *Oryza sativa* L., in the callus derived from the

seminal root. *Proc Jpn Acad* 44: 549-553.

Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60: 197-214.

Lestari EG (2006) *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *BIODIVERSITAS* 7 (3): 297-301.

Maeda E (1968) Subculture and organ formation in the callus derived from rice embryos *in vitro*. *Proc Crop Sc Jpn* 37: 51-58.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Ngezahayo F, Dong Y, Liu B (2007) Somaclonal variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis. *J Appl Genet* 48 (4): 329-336.

Nishi T, Yamada Y, Takahashi E (1968) Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. *Nature* 219: 508-509.

Nghiêm Như Vân (1983) Tạo cây lúa lưỡng bội từ mô sẹo nhận từ thân cây đơn bội. *Tap chí Sinh học* 5(3): 16-17.

Phan Thị Bảy, Lê Thị Muội, Nguyễn Đức Thành (2001) Những biến đổi phân tử ở các dòng lúa kháng dịch nấm gây bệnh đạo ôn *Pyricularia oryzae*. *Tap chí Sinh học* 23(2): 32-38.

Phong DT, Muoi LT, Binh LT (2001) RAPD variability in rice (*Oryza sativa* L.) plants derived from desiccation-tolerant calli. *Euphytica* 121: 297-303.

Rasheed S, Fatima T, Husnain T, Bashir K, Riazuddin S (2005) RAPD characterization of somaclonal variation in *indica* Basmati rice. *Pak J Bot* 37(2): 249-262.

Rohlf FJ (1993) NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate system. Version 1.80. Applied Biostatistics Inc., New York.

Scowcroft WR (1985) Somaclonal variation: the myth of clonal uniformity. In: Bohn B, Denis ES (Eds.) *Plant Gene Research, Genetic-fluxes in Plants*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo: 217-245.

Street HE (1957) Excised root culture. *Biol Rev* 32: 117-155.

Tamura S (1968) Shoot formation in calli originated from rice embryo. *Proc Jpn Acad* 44: 543-548.

## EFFECTS OF NaCl STRESS ON THE GENOME STRUCTURE STABILISATION OF RICE *ORYZA SATIVA* CELLS LONG-TERM CULTURED *IN VITRO*

Nguyen Thanh Thuy, Do Quang Binh\*

Institute of Biotechnology

### SUMMARY

*In vitro* culture of plant cells is a useful tool for studies relating the biological transformation from a single cell to the whole plant *in vitro*. Using the *in vitro* technology, researchers are able to not only control the biological reaction chains but also to create a number of new products other than those of the initial materials. However, growing in the *in vitro* artificial conditions for a long time, plant cells could not avoid the phenomenon of soma variation. The level of variation of the cultured cells depends on various factors, including the genotype and physiological state of initial materials, the culture conditions, the culture time, etc. This study presents results relating the molecular changes in the genome of rice (*Oryza sativa*) cells that have been cultured for a long time in different salt (NaCl) stress conditions by RAPD technique. In comparison with the initial material, not derived from the culture *in vitro* of isolated cells, genome of cells cultured in a condition without NaCl stress bears more molecular changes than that of cells continuously cultured in the salt stress condition. Though cells of the two culture conditions shared several specific changes, induced by the long-term culture *in vitro*, the salt stress adapted cells shared more common similarities with the initial material than the non stressed cells. Results obtained from the present study are in accordance with our previous observations, carried out at the cell level, that the totipotency of the isolated rice cells has been stabilized much better in the suitable salt stress culture condition than in the condition without the stress factor.

**Keywords:** Differential variation, genome stability, long-term cell culture, NaCl stress, *Oryza sativa*

---

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-38363470; Fax: 84-4-38363144; E-mail: [dqbinh@ibt.ac.vn](mailto:dqbinh@ibt.ac.vn)